

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫名稱：

新真菌代謝物 SHY-5501HC 之化學構造分析與生物活性測試

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC89-2113-M-038-001

執行期間：自民國 88 年 08 月 01 日起至民國 89 年 07 月 31 日

計畫主持人：許元勳

執行單位：台北醫學大學醫學研究所

中華民國九十年二月二十五日

一、中文摘要

微生物的代謝產物富含多樣且複雜的新天然化合物，是「新藥開發」重要的資源和基礎之一。真菌屬雙形性真核高等微生物，其代謝產物較一般細菌豐富且種類繁多，在上一次計劃裡我們曾針對土壤真菌，進行其菌種分離培養及其生理及藥裡活性天然代謝產物之探索研究。在系列篩選的過程中曾發現有一株屬於不完全菌類 (Imperfect fungi) *Myrothecium* 菌屬之土壤分離菌株，可分泌一系列 myrocins 類似物之新型雙帖類 (diterpenes) 代謝物。本年度為延續此一研究工作並擬證實其 *in vivo* 對細胞之毒殺作用及抗腫瘤動物實驗效果，以提供後續新藥開發時之必要參考，乃重新進行這類型菌屬之大量發酵及其代謝成分分析。並根據過去的篩選經驗，從本地土壤中篩選得到一疑似能分泌 myrocins 類似物之絲狀型真菌菌株，並發現其發酵培養液中溶存有別於 myrocins 之新類似代謝物，特命名為 SYH-5501HC。該代謝物經 Amberlite XAD-2 多孔吸附性樹脂、Silica gel 順相矽膠及 Sephadex LH-20 膠體過濾等過程進行分離純化後，並以 EI-MS、CI-MS 等質譜分析，以及 1D ^1H 、 ^{13}C -NMR 和 2D ^1H - ^1H COSY NMR 等核磁共振光譜分析所得之結果證實，此代謝物為分子量 324，分子式 $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_4$ ，含 γ -lactone 環，分子結構上類似 myrocins 之新衍生物；此一物質再進一步針對肝癌細胞 HepG₂ 偵測其影響發現，此代謝物可有效抑制其增殖並可誘發其產生凋零化死亡。

關鍵詞：真菌、代謝產物、抗腫瘤、肝癌細胞、凋零化死亡

二、英文摘要

As a part of our screening program in search of antitumor actives from microbial sources, we have reported the myrocins, a new structural class of antitumor agents produced by a strain of *Myrothecium* sp., a genus of imperfect fungi. The two major components of myrocins were previously characterized to be pentacyclic diterpenes with a cyclopropyl ring and a γ -lactone ring in their molecules. In connection with our work on the fungal metabolites, we further investigated the classically related strain of *Myrothecium* from domestic soils. This has resulted in the discovery of a strain of myrocins producing fungus that was capable of secreting another novel metabolite, compound NO. SYH-5501HC. The new compound was elucidated to be a tetracyclic one and was revealed to comprise an α , β -unsaturated ketone and a remarkable γ -lactol ring in its molecule. The analytical results of its EI- and CI-MS spectra in combining with the NMR data revealed that its molecule formula is $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_4$ (MW=324). The structure of this microbial product was finally proposed to be structurally related to the myrocins through various NMR(1D ^1H , ^{13}C -NMR as well as 2D ^1H - ^1H COSY NMR) analyses, nevertheless, it showed slightly inhibitory activity against tumor cell lines being tested including HepG2 *in vitro* resulting in cell apoptosis. In this fiscal year, we attempt to further confirm the molecular structure of

this new natural product together with its stereo configuration. Moreover, we have noticed that this particular entity also show cytotoxicity to leukemia HL-60 cell and human lung cancer cell lines. Further study is necessary to confirm the activity of both of the cell lines mentioned above as well as the detail mode of action of the new metabolite. These finding might provide a clue for study of the structure-activity correction to such types of microbial products.

Keywords : Fungus, metabolites, antitumor, HepG₂

三、緣由與目的

本研究之主要目的乃在接續過去所執行自本土性真菌之發酵培養液中，偵測所得之新代謝物 SYH-5501HC，針對此一物質之大量發酵生產及回收純化進行評估，並擬其針對其化學結構及其對人類癌細胞株之作用等生物活性進行進一步之確認及分析探討，以確認此一新天然物之完整分子結構並確認其對特定癌細胞株之細胞毒性及研究可能之作用機轉，包括目前所預測之 topoisomerase I 之抑制活性及對特定細胞 apoptosis 之誘發活性等。為了達成此一目的，針對此一物質生產菌株之安定化以及標的天然物之大量製備和提純以供應研究所需乃屬第一要務，其次乃在包括此物質相關衍生物之製備及其有機光譜之測試以確認構造並提供生物活性測試之預測及確認。本報告即為針對 SYH-5501HC 物質之大量發酵生產回收、化學分離純化及其物理化學特性、以及其生物活性評估測試之研究結果做一綜合性說明。

四、結果與討論

1. 菌種醱酵及大量培養

首先刮取定量已預先培養於 PDA(potato dextrose agar)固態培養基之 編號為 SYH-8501 的絲狀型真菌成熟孢子，添加於 0.9% 無菌生理食鹽水中含孢子溶液。經無菌紗布過濾後，再以 Tween 80 均勻分散，調製成每一 ml 0.9% 生理食鹽水和 0.5% Tween 80 混合溶液中含 2×10^6 個孢子之含菌懸浮液。以此含菌懸浮液為接種源以 5% (v/v) 接種量接至以葡萄糖、大豆粉和酵母粉為營養主體培養基之 3 l / 5 l 之血清瓶中，於 28°C，進行通氣式培養，連續培養 7 天，得菌種醱酵培養液。

2. 微生物醱酵培養液之前處理

將醱酵培養菌液以 3500rpm 低溫離心 15min 得上清液，接著利用 1N HCl 和 1N NaOH 調整其 pH 值至中性，再以疏水性吸附樹脂 Amberlite XAD-2 吸附 發酵上清液中之代謝物成分，配合生物及化學檢定之追蹤以 80% 甲醇為沖提液沖提可收集含標的物質之大部分；此沖提部份再經 pH 值調整至中性，減壓濃縮揮發甲醇後，接著以乙酸乙酯進行酸鹼萃取轉溶可得具生物活性之中性萃取畫分。最後再以脫水減壓濃縮之方式去除有機溶劑，接著以甲醇等有機溶劑回溶和離心兩個步驗處理後即可得含 SHY-5501HC 微生物代謝物之

前處理試樣。平均每公升發酵菌液可得約 300 mg 回收萃取物。

3. SHY-5501HC 微生物代謝物之分離純化

將上述所得之前處理試樣，以矽膠薄層色層分析方法進行有機中性萃取濃縮物中所溶存代謝物之成份分佈及液相色層分析之分佈圖譜，並以 bioautography 方法追蹤標的活性物質，以做為分離純化之依據。此標的活性物質進一步再以矽膠層析管柱 (70-230 mesh, 沖題液為 chloroform ethyl: acetate = 90:10), Sephadex LH-20 (Pharmacia, 沖題液為 methanol: acetone = 95:5), 以及逆相 C18 中壓層析管柱 (移動相為 acetonitrile: H₂O = 85:15) 等方式進行物質，所得物質最後之純度則採用晶析物質之熔點測定，以及高效液相層析儀 (HPLC) 分析之方式確定其純度。經分離純化後平均每公升發酵菌液可得 0.8 mg SHY-5501HC 純化物。

4. SHY-5501HC 微生物代謝物之物理化學性質分析和結構鑑定

SHY-5501HC 物質屬中性無色針狀結晶，融點為 212-214°C，比旋光度為 -91.5° (c=0.15, MeOH)。本物質 EI-MS 和 CI-MS 之 molecular ion peak 分別為 m/z 326 (EI) 和 m/z 327 (I-C₄H₁₀·Cl)。由 1D ¹H, ¹³C-NMR 和 2D ¹H-¹H COSY NMR 等核磁共振光譜分析所得之結果可知，此代謝物分子量為 324，分子式為 C₂₂H₂₂O₄。本物質之 UV 紫外光光譜於 287nm 可見最大吸收光譜 (MeOH, 係光係數 ε = 9,700)。配合核磁共振光譜之解析結果。從 IR 紅外光光譜於 3500-3420 cm⁻¹ 歸屬為含 OH 基。1830 cm⁻¹ 歸屬為含 γ-lactone 環，1670 與 1620 cm⁻¹ 兩處歸屬為含 α, β-共軛 C=O 基。由以上光譜分析之證據可知 SHY-5501HC 物質屬雙帖類。

5. SHY-5501HC 微生物代謝物 *In vitro* 細胞毒性測試

在 MTT 細胞毒性測試方法進行抗腫瘤活性檢定，我們仍選擇人類鼻咽癌上皮細胞作為測試對象；亦即是先將培養足量之腫瘤細胞調製成 5X10³ cell/ml，取 100μl/well 接種於 96well microplate 中，於 37°C，5% CO₂ 條件下進行前培養 24 小時後，添加 10μl/well 受檢試樣，於 37°C，5% CO₂ 條件下培養 3 天。當培養終止前 4 小時時添加 MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-2 H-tetrazolium bromide) 試劑，於室溫下以振盪器振盪數分鐘使其均勻後，於分光光度計測其 590 nm 吸光度，並換算成 50% 細胞生長抑制率 (IC₅₀) 之濃度。此外在細胞毒殺活性評估方面，我們主要以人類急性前髓白血病細胞 (human promyelocytic leukemia HL-60 cells) 和人類肝癌細胞 (HepG₂) 為主亦比照同法針對標的物質進行測試。同時亦針對 lung cancer cell line, colon cancer cell line, HepG₂ 等癌細胞株，抽取 topoisomase I 進行酵素抑制活性之確認並探討活性劑量之相關性。針對細胞之 apoptosis，在實驗中採用了 flow cytometry 偵測方法並結合顯微鏡之鏡檢和 total DNA fragmentation 之電泳分析來偵測其誘發活性。由目前所得之初步結果研判，微生物代謝物 SHY-5501HC 物質對 HepG₂ 細胞株稍具毒性。而在其它所檢測的腫瘤細胞株中因受限於檢測試樣之量化，因此仍有待進一步試驗。

五、計畫成果自評

此類型天然物在微生物之代謝產物中並不多見，其中尤以本 SYH-5501HC 物質在生物活性之初步檢測上已可觀測到可有效抑制 topoisomerase I 之酵素活性，並於低於 100 μ g/ml 之濃度下可清楚誘發 human hepatoma HepG₂ 和 human promyelocytic leukemia HL-60 發生 apoptosis 現象之發生，惟這些生物活性仍有待進一步追蹤確認。從過去之研究報導可知，有些作用機轉為抑制在腫瘤細胞之 topoisomerase I 之抗癌藥物，如 camptothecin, adriamycin C 等，可透過 ROI (Reactive Oxygen Intermediates) 或細胞表面接受器之訊息傳遞途徑，造成蛋白分解酵素 Caspases (III and IIX) 之活化，因而引發 PKC (Protein Kinase C) 等酵素之磷酸化，間接造成 NADPH oxidase 活化而引發細胞內 ROS (Reactive Oxygen Species) 如 H₂O₂ 之累積；透過 catalase 催化轉換生成 \bullet OH繼續攻擊細胞核內之染色體 DNA 造成 apoptosis 之產生。從各種研究跡象顯示，SYH-5501HC 對人類癌細胞之活性與上述之機轉類似，因此就開發新抗癌藥物的觀點而言，針對本物質之深度追蹤探討是有其學術及實用性等多方面之意義的。本年度計畫之執行大體仍能依照預定目標完成，對所欲探索的標的物質亦已確立了大量回收萃取和分離純化之流程；此外藉由本研究對此一微生物代謝物之分子結構亦有了較清楚之輪廓，然因受限於經費短缺在天然物之量化生產、回收製備、分子構造確定、以及所欲發展之後續動物性實驗生物活性評估等研究工作，均無法如預期之規劃順利開展，殊為可惜。科學研究工作之進展和互動，其競爭相當激烈且瞬息萬變；然本計畫在有限之人力物力條件下，已獲致階段性成果。本研究報告之相關成果目前已分別發表於國內各學術會議上。且目前亦增補一些實驗數據著手撰稿預備發表於微生物代謝活性產物之相關國際期刊。

六、參考文獻

1. Hsu, Y. -H.; Nakagawa, M.; Hirota, A.; Shima, S.; Nakayama, M., *Agric. Biol. Chem.* 1988, 52, 1305-1307.
2. Nakayama, M.; Hsu, Y. -H.; Hirota, A.; Shima, S.; Nakayama, M.; *J. Antibiot.* 1989, 42, 218-222.
3. Hsu, Y. -H.; Hirota, A.; Shima, S.; Nakagawa, M.; Nakayama, M.; *J. Antibiot.* 1989, 42, 223-229.
4. Chu-Moyer, M. Y.; Danishefsky, S. *Tetrahedron lett.* 1993, 34, 3025-3028.
5. Chu-Moyer, M. Y.; Danishefsky, S. *J. Am. Chem. Soc.* 1994, 116, 11213-11228.
6. Schummer D.; Jahn T.; Hofle G.; *Liebigs Ann.* 1995, 803-816.
7. Hsu, Y. -H., "Myroxone, a new fungal metabolite -Structure determination.". Conference on NMR Technology, Taipei, Taiwan. P.24, June, 1998.
8. Hsu, Y. -H., " Myroxone, a new metabolite from myrocins producing *Myrothecium* sp.", The 5th Biomedical Material & Technology Symposium, Taoyen, Taiwan, Nov 21-22, 1998.